

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **62192662 A**

(43) Date of publication of application: **24 . 08 . 87**

(51) Int. Cl

**G01N 33/543**  
**C12Q 1/00**  
**G01N 33/53**  
**G01N 33/577**

(21) Application number: **61033863**

(22) Date of filing: **20 . 02 . 86**

(71) Applicant: **NITSUSUI SEIYAKU KK NIPPON  
BIO TESUTO KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **YOSHIKAWA KAZUAKI  
KATO HIDEO**

(54) **HIGH SENSITIVITY QUANTITATIVE  
DETERMINATION OF CRP**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To improve specificness and measurement sensitivity and to make quantitative determination of a low concn. of C reactive protein (CRP) by using an anti-CRP mouse monoclonal antibody as a solid phase forming antibody and enzyme labeling antibody.

**CONSTITUTION:** The anti-CRP mouse monoclonal antibody is used both as the solid phase forming antibody and enzyme labeling antibody at the time of making quantitative determination of the CRP in a sample contg. a slight amt. of the CPR by a sandwich method. The monoclonal antibody is brought into reaction with the sample, then the activity of the labeling enzyme

contributing to the antigen-antibody reaction by which the CRP is quantitatively determined. The solid phase forming antibody and enzyme labeling antibody and the CRP which is the measuring antigen can be simultaneously brought into reaction in the actual execution stage so that just one time of cleaning operation is required. The anti-CRP mouse monoclonal antibody to be used for the solid phase forming antibody and enzyme labeling antibody is preferably  $\cong 2$  kinds of the monoclonal antibodies which are different from each other and conjugate each other by recognizing the respectively different antigen determination parts of the CRP which is the measuring antigen and further the antibodies which exhibit a settling reaction are more preferable.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-192662

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>G 01 N 33/543  
C 12 Q 1/00  
G 01 N 33/53  
33/577

識別記号

庁内整理番号

C-7906-2G  
8412-4B  
D-7906-2G  
7906-2G

⑭ 公開 昭和62年(1987)8月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 CRPの高感度定量法

⑯ 特 願 昭61-33863

⑰ 出 願 昭61(1986)2月20日

⑱ 発 明 者 吉 川 和 明 東京都北区志茂2-30-2  
⑱ 発 明 者 加 藤 英 夫 水海道市天満町1711-1  
⑲ 出 願 人 日 水 製 薬 株 式 有 限 公 司 東京都豊島区巣鴨2-11-1  
⑲ 出 願 人 株式会社日本バイオテ 国分寺市東戸倉1-15-3  
スト研究所  
⑳ 代 理 人 弁理士 佐々木 功

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

CRPの高感度定量法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 微量の CRP を含有している試料中の CRP をサンドイッチ法により定量するに際して、固相化抗体及び酵素標識抗体として共に抗 CRP マウスモノクローナル抗体を用い、該モノクローナル抗体を上記の試料と反応させ、次いで抗原抗体反応に参与した標識酵素の活性を測定して CRP を定量することを特徴とする、CRP の高感度定量法。

(2) 固相化抗体及び酵素標識抗体と測定抗原である CRP とを同時に反応させることを特徴とする、特許請求の範囲第 1 項に記載の CRP の高感度定量法。

(3) 固相化抗体及び酵素標識抗体に用いる抗 CRP マウスモノクローナル抗体が、測定抗原のそれぞれ異なる抗原決定部位を認識して結合する少なくとも 2 種の互いに異なるモノクローナル抗体であることを特徴とする、特許請求の範囲第 1

項に記載の CRP の高感度定量法。

(4) 固相化抗体及び酵素標識抗体に用いる抗 CRP マウスモノクローナル抗体が沈降反応を呈するものであることを特徴とする、特許請求の範囲第 1 項に記載の CRP の高感度定量法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は CRP 即ち C 反応性蛋白の定量法に係り、殊にその高感度定量法に係る。

CRP は、周知のように、炎症や組織壊死が生ずる場合に血中に出現する特性を有している蛋白であるが、正常人の血清中にも微量の CRP が存在していることが明らかとなり、その機能が解明されつつある。又、微量 CRP の定量が新生児における感染症の早期診断に有用であるとの報告もなされている。

従って、本発明による定量法は上記の炎症や感染症等の臨床診断における検査法の一つとして利用することができる。

(従来の技術)

従来における CRP の定量法としては毛細管法、ラテックス凝集法、一元免疫拡散法及び免疫比濁法がある。

これらの従来法は、何れも試料中の CRP 濃度が低い場合にはその測定が困難乃至不可能であり、そのために CRP 濃度が低濃度域において変動する場合にはその動態把握に難点を生ずる。

低濃度における抗原の測定に際しては、一般に、EIA (酵素免疫測定法) において汎用されているサンドイッチ法を適用するのが有効とされており、この場合に一般に抗体としてポリクローナル抗体が採用されている。

(発明が解決しようとする問題点)

抗 CRP ポリクローナル抗体を用い且つサンドイッチ法を適用して CRP 抗原を定量することを目的として、高感度な且つ特異性の高い測定系を確立するためには、ポリクローナル抗体を親和性クロマトグラフィー等により充分に精製する必要がある。又、ポリクローナル抗体は免疫動物の個体差等により異なるものとなり、従って常に一定

いる試料中の CRP をサンドイッチ法により定量するに際して、固相化抗体及び酵素標識抗体として共に抗 CRP マウスモノクローナル抗体を用い、該モノクローナル抗体を上記の試料と反応させ、次いで抗原抗体反応に関与した標識酵素の活性を測定して CRP を定量することにより、上記の基本的目的を達成することができる。

本発明方法の実施に際して、固相化抗体及び酵素標識抗体と測定抗原である CRP とを同時に反応させることができ、この場合には洗浄操作が一回で済むので上記の附随的目的を達成することができる。

固相化抗体及び酵素標識抗体に用いる抗 CRP マウスモノクローナル抗体は、測定抗原である CRP のそれぞれ異なる抗原決定部位を認識して結合する少なくとも 2 種の互いに異なるモノクローナル抗体であるのが好ましい。固相化抗体及び酵素標識抗体に用いる抗 CRP マウスモノクローナル抗体は沈降反応を呈するものであるのが好ましい。

の品質乃至性質を有する抗体を調製することが困難であると謂う問題を有していた。

更に、サンドイッチ法による測定中には、固相化抗体と測定抗原との反応後及び酵素標識抗体との反応後にそれぞれ洗浄を行うことが通常必要とされるために、工程数が増加し、操作の所要時間が長くなる点に問題があった。

(発明の目的)

従って、本発明の主たる目的は、従来法では測定不可能とされる程低濃度域の CRP を測定可能となす、CRP の高感度定量法を提供することにある。

本発明の附随的目的は、操作が簡便であり且つ所要時間の短い、CRP の高感度定量法を提供することにある。

(目的を達成するための手段及び作用)

本発明方法は、固相化抗体及び酵素標識抗体としてモノクローナル抗体を用いることを基本とするものである。

本発明方法によれば、微量の CRP を含有して

抗体の標識に用いられる酵素としては慣用のもの、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等から選択された任意のものを用いることができる。標識を付すためには、自体周知の任意の方法、例えば過沃素酸法、マレイミド法等を採用することができる。

抗原抗体反応に関与した標識酵素の活性測定も自体公知の方法により実施することができ、例えば標識酵素としてアルカリホスファターゼを用いた場合には、Kind-King 法により活性の測定を行うことができる。

尚、測定試料中の CRP の定量は測定された吸光度値を標準検量線に照合することにより行うことができる。

(発明の効果)

抗原抗体反応を利用し且つ所謂サンドイッチ法により CRP を定量する方法において、本発明方法によれば、固相化抗体及び酵素標識抗体として共に抗 CRP マウスモノクローナル抗体を用いて

いるので特異性及び測定感度を向上させることができ、従来極めて困難乃至不可能とされていた程の低濃度の CRP を定量することができる。又、モノクローナル抗体を利用するために、常に一定の性質乃至品質を有する固相化抗体及び酵素標識抗体を調製することができるので、定量結果の信頼性が向上する。

尚、本発明方法の実施に際しては、固相化抗体及び酵素標識抗体と測定抗原である CRP とを同時に反応させる、所謂 1 ステップサンドイッチ法を採用することができるので操作を簡便化できる。

#### (実施例)

##### a) 抗 CRP マウスモノクローナル抗体の作製

CRP 陽性血清を原料とし、硫酸分画、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、 $\text{Ca}^{2+}$  沈澱、セファクリル S - 300 ゲル濾過により精製した CRP を BALB/C 系マウスに免疫し、その脾細胞をマウス骨髓腫細胞 (P3U1) と融合させたハイブリドーマから 5 種類のモノクローナル抗体 (CRB17、

CRB20 の 2 種類からなるグループと、CRB18 と CRB19 と CRB23 の 3 種類からなるグループとに分かれる。このことは、各グループが CRP 分子上の異なる抗原決定部位を認識して結合するものであることを示唆している。

##### c) 固相化抗体の調製

上記の a) 項に記載の方法により得た抗ヒト CRP マウスモノクローナル抗体を 0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で稀釈して 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗体溶液とし、ヌンク社製のマイクロタイタープレートの各ウェルに 200  $\mu\text{l}$  宛分注した。このマイクロタイタープレートを 4℃ で 24 時間放置した後、ウェル内容物を除去し、蒸留水で洗浄した。次いで各ウェル内に 1% 牛アルブミン含有燐酸緩衝食塩水 (pH 7.2) を 200  $\mu\text{l}$  宛分注し、4℃ で更に 24 時間放置して固相化抗体とした。尚、この固相化抗体は使用に先立ち蒸留水で洗浄される。

##### d) 酵素標識抗体の調製

アルカリホスファターゼ (仔牛小腸由来、ペーリンガー社製) 3  $\text{mg}$  を 1M 塩化マグネシウム含

CRB18、CRB19、CRB20、CRB23) を得た。これらのモノクローナル抗体については硫酸分画、DEAE イオン交換クロマトグラフィー及びプロテイン A セファロース CL - 4B (ファルマシア社製) により精製した。

尚、抗体産生細胞を無血清培地で培養した培養上清を濃縮し、50% 飽和硫酸でモノクローナル抗体を硫酸分画することによってもモノクローナル抗体を回収することができる。

##### b) 抗 CRP マウスモノクローナル抗体による沈降反応

寒天ゲル内の中心孔に CRP 1 $\text{mg}/\text{ml}$  を置き、周囲にモノクローナル抗体を置いて Ouchterlony のゲル内沈降反応を行った。上記の a) 項に記載の方法で得た 5 種類のモノクローナル抗体は何れも沈降反応を呈した。尚、CRB18、CRB19 及び CRB23 の各々は complete fuse したが、CRB17 及び CRB20 と CRB18、CRB19 及び CRB23 とは double spur 様な形態を呈し、従ってこれらの 5 種類のモノクローナル抗体は CRB17 と

有 0.1M N,N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - グリシン緩衝液 (pH 8.5) 1  $\text{ml}$  に添加して溶解させ、次いで過沃素酸カリウム 20  $\text{mg}$  を添加し、37℃ で 2 時間放置した。その後に 800 rpm で 5 分間遠心して不溶物を除去し、上清を 1M 塩化マグネシウム含有 0.1M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で一晚透析した。次いで、上記の a) 項で得た抗 CRP マウスモノクローナル抗体 1.5  $\text{mg}$  を添加し、4℃ で 14 日間放置し、1% 牛アルブミン含有燐酸緩衝食塩水で 50 倍に稀釈した後に凍結保存した。尚、使用時には、0.1% 牛アルブミン含有燐酸緩衝食塩水で稀釈される。

##### e) 測定法

上記の d) 項に記載の方法により得た、酵素標識抗体の稀釈液 200  $\mu\text{l}$  を抗体固相化マイクロタイタープレートの各ウェルに分注し、試料 CRP 濃度 6.25 - 400  $\text{ng}/\text{ml}$  20  $\mu\text{l}$  を添加し、室温で 2 時間反応させた後に内容物を蒸留水で洗浄する。次いで、アルカリホスファターゼ活性測定用基質 (4.5M フェニル燐酸 2 ナトリウム及び

2mM 4 - アミノアンチピリン含有 0.05M 炭酸緩衝液, pH 10.2) を 200  $\mu$ l 添加し、室温で 20 分間反応させる。その後、発色液 (0.8% 過沃蘇酸ナトリウム溶液) 100  $\mu$ l を添加して酵素反応を停止させると共に発色させ、次いで ELISA アナライザ (ETY - 96) を用いて吸光度を測定した。

f) 結果

上記の a) 項に記載の方法により得た 5 種類の抗 CRP マウスモノクローナル抗体を用い、上記の c) 及び d) 項に記載の方法に従い固相化抗体及び酵素標識抗体を調製し、これらを用いて、各種 CRP 濃度の試料について、上記の e) 項に記載の操作手順に従い、吸光度 (500nm) の測定を行ない、CRP 濃度と吸光度との関係調べた処、第 1 - 5 図に示される結果が得られた。

これらの結果から、本発明方法によれば測定感度が極めて良好であること並びに 5 種類のモノクローナル抗体における 2 つのグループ (上記の b) 項参照) を適宜選択することにより感度を更に向上させ得ることが判る。

尚、CRP 濃度が未知の試料の CRP を定量する場合に、第 1 - 5 図に示されるグラフを標準検量線として用いることができる。

4. 図面の簡単な説明

図面は、本発明による CRP の高感度定量法における、CRP 濃度と吸光度との関係を示すグラフであり、第 1 図、2 図、3 図、4 図及び第 5 図はそれぞれ CRB17、CRB18、CRB19、CRB20、CRB23 を固相化抗体として用い且つこれら 5 種類のモノクローナル抗体を酵素標識して調製したものを酵素標識抗体として用いた場合を示している。

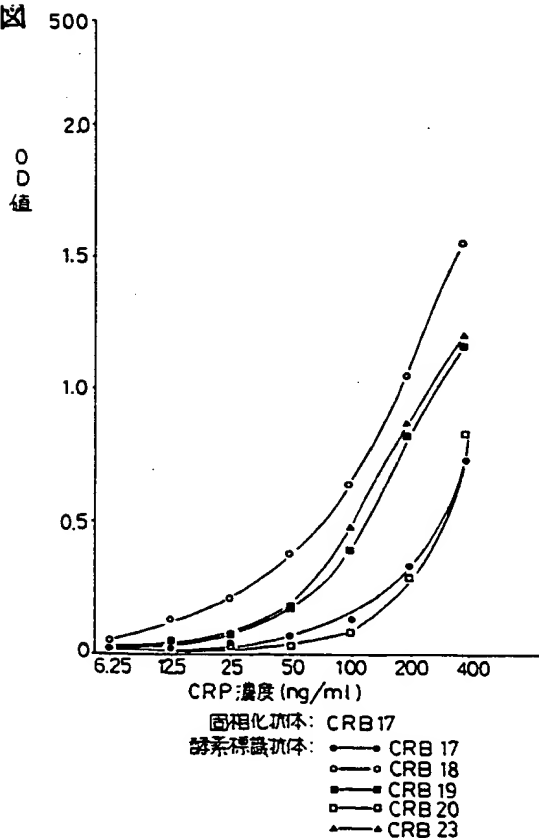
特許出願人 日水製薬株式会社

同 株式会社日本バイオテスト研究所

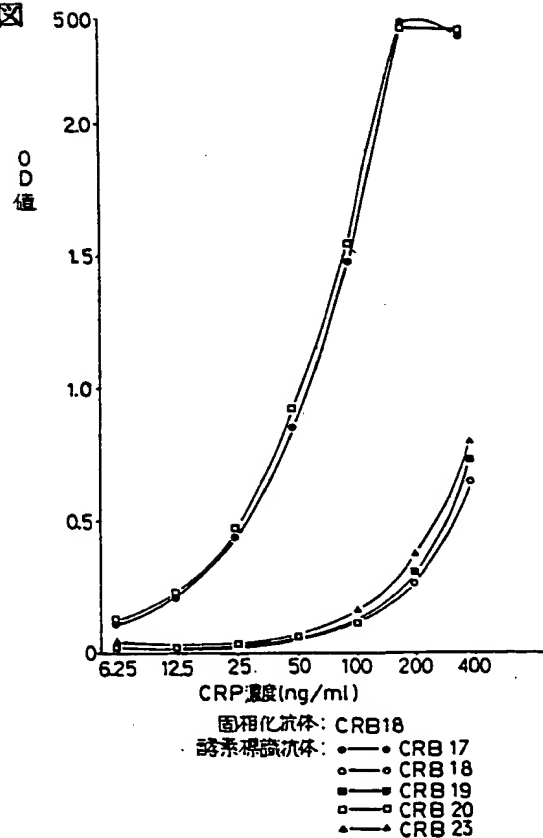
代理人 弁理士 佐々木 功



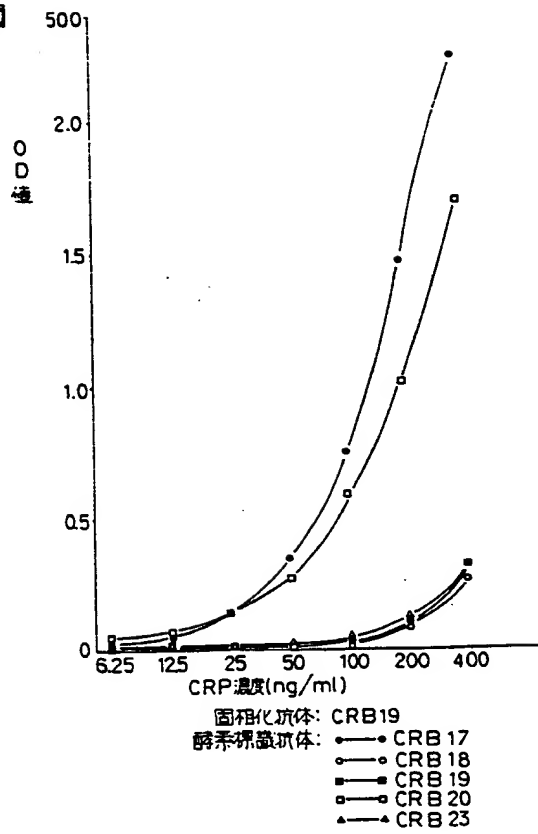
第1図



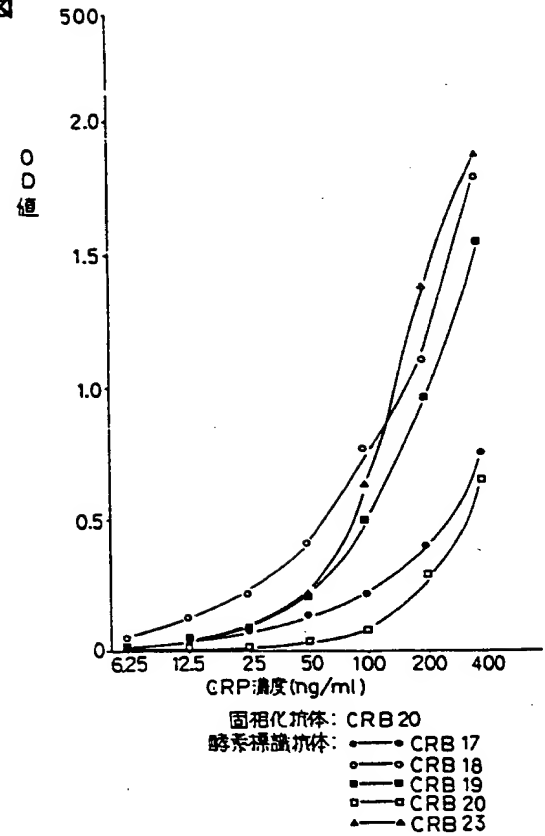
第2図



第3図



第4図



第5図

